昆虫学报 Acta Entomologica Sinica，February 2002，45（1）：58 – 62　ISSN 0454-6296

桔全爪螨的抗药性选育及其解毒酶活力变化

孟和生*，王开运，姜兴印，仪美芹
（山东农业大学植物保护系，泰安　271018）

摘要：在室内模拟田间药剂的选择压力，用齐墩螨素和甲氰菊酯对桔全爪螨 *Panonychus citri* 逐代处理，以选育其抗药性种群。选育至12代，对齐墩螨素抗性增长到7.30倍，对甲氰菊酯抗性增长到17.11倍。增效剂和离体酶活性的测定结果表明，抗性种群的乙酰胆碱酯酶和多功能氧化酶的活性都提高了；推测羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶、多功能氧化酶和谷胱甘肽-S-转移酶比活力的增加是桔全爪螨对甲氰菊酯产生抗性的主要原因。

关键词：桔全爪螨；齐墩螨素；甲氰菊酯；抗性选育；解毒酶
中图分类号：S436.661.2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）01-0058-05

Studies on resistance selection by abamectin and fenpropathrin and activity change of detoxicant enzymes in *Panonychus citri*

MENG He-Sheng，WANG Kai-Yun，JIANG Xing-Yin，YI Mei-Qin（Department of Plant Protection，Shandong Agricultural University，Tai'an　271018，China）

Abstract: Studies on resistance selection by abamectin and fenpropathrin and activity change of detoxicant enzymes of *Panonychus citri*（McGregor）were carried out in laboratory. *P. citri* was separately treated with abamectin and fenpropathrin imitating field chemicals selection pressure in order to breed its resistance. The results showed that the resistance has respectively reached 7.30-fold to abamectin and 17.11-fold to fenpropathrin after 12 times selection. The resistance mechanism was evaluated by activity measurement of enzymic inhibitors and detoxicant enzymes. It was concluded that the rise of resistance to abamectin was mainly associated with the increasing activities of acetylcholinesterase and mixed-function oxidases. The resistance to fenpropathrin was attributed to carboxylesterase，acetylcholinesterase and glutathione transferase.

Key words: *Panonychus citri*；abamectin；fenpropathrin；resistance-selection；detoxicant enzymes

桔全爪螨 *Panonychus citri* 又称柑桔红蜘蛛、腐皮红蜘蛛，属蜱螨目、叶螨科，是一种世界性的柑桔害虫，在我国柑桔产区危害严重，影响果品的产量和品质。对桔全爪螨的防治，目前仍以化学农药为主，由于螨体小、世代多、繁殖速度快、发育历期短的特点，该螨极易对药剂产生抗性。本研究的目的是通过室内桔全爪螨抗药性的选育，探讨其对齐墩螨素和甲氰菊酯抗性的发展动态及其解毒酶活力变化，为桔全爪螨的抗性治理提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　供试螨

桔全爪螨采自山东农业大学校园内枸桔上，从未使用过化学农药，敏感度较高。在养虫室内用盆栽柑桔饲养，温度25～28℃，相对湿度控制在60%～90%。

1.2　供试药剂

齐墩螨素（abamectin），1%乳油（浙江海正股份有限公司）；甲氰菊酯（fenpropathrin），20%乳油（东阳市金鑫化学工业公司）；增效磷（SV_1），98%原油（中国科学院动物研究所）；增效醚（piperoayl butoxide，PBO），92%原油（日本高沙化学公司）；磷酸三苯酯（triphenyl phosphate，TPP），化学纯（上海化学试剂一厂）；顺丁烯二酸二乙酯（diethyl maleate，DEM），化学纯（上海化学试剂三厂）。

1.3　毒力测定方法

参照联合国粮农组织（FAO，1980）推荐的测

基金项目：国家“九五”科技攻关资助项目（96-005-01-08-4）
第一作者简介：孟和生，男，1974年1月生，汉族，山东东平县人，农药学硕士，现在南开大学农药国家工程研究中心工作，助理工程师，现从事新农药的开发以及害虫抗药性研究，E-mail: menghs@eyou.com
收稿日期 Received：2000-06-12；接受日期 Accepted：2001-01-03

定害螨抗性的标准方法——玻片浸渍法，并加以改进。将螨背部粘在载玻片的双面胶带上，每片粘4行，每行粘10头，4 h后检查，剔除死亡或不活泼个体。带螨玻片置于系列浓度的药液中，轻轻摇动5 s后取出，迅速用吸水纸吸干螨体及其周围多余的药液，放在温度25±1℃，相对湿度85%左右的生化培养箱中，24 h后用双目镜检查结果。用毛笔轻触螨体，以螨足不动者为死亡。每一浓度重复3次，另以浸渍清水的作为对照。对照组死亡率在10%以下为有效试验，所得数据经Finney机率分析法用计算机求出毒力回归式及半致死浓度LC_{50}。

1.4　抗性选育方法

采集的桔全爪螨在养虫室内饲养稳定2代后，测定亲代（F_0）对齐墩螨素和甲氰菊酯的毒力基线，然后分别以杀死种群60%～70%个体的剂量处理成螨，存活个体继续饲养，逐代连续处理存活个体的子代，每隔3代测定一次LC_{50}，比较抗性增长倍数。

1.5　抗性机理研究

1.5.1　增效剂测定法：以抗齐墩螨素品系RF_{12}和抗甲氰菊酯品系RF_{12}雌成螨为试螨，将增效剂（PBO、TPP、DEM、SV_1）与药剂按有效成分3:1的比例混合，参照玻片浸渍法测定药剂和混剂对桔全爪螨的毒力（增效剂在测定范围内对桔全爪螨均无直接杀伤作用），比较LC_{50}值，计算增效作用。增效比＝药剂的LC_{50}值/（药剂的LC_{50}值＋增效剂的LC_{50}值）。

1.5.2　生化分析法：（1）羧酸酯酶比活力测定（姜家良等，1980）：以α-乙酸萘酯作底物，底物溶液中加毒扁豆碱。将螨体置于0.04 mol/L磷酸缓冲液（pH 7.0）中，冰水浴充分匀浆，然后在高速冷冻离心机上以10 000 r/min离心，取上清液作酶源。反应条件为30℃，保温30 min。（2）乙酰胆碱酯酶比活力测定（陈巧云等，1980）：以碘化硫代乙酰胆碱作底物，将螨体置于0.1 mol/L磷酸缓冲液（pH 7.4）中，冰水浴充分匀浆，以10 000 r/min高速冷冻离心，取上清液作酶源。反应条件为27℃，保温15 min。（3）谷胱甘肽-S-转移酶比活力测定（慕立义，1994）：以谷胱甘肽作底物，将螨体置于60 mmol/L磷酸缓冲液（pH 7.0）中，冰水浴充分匀浆，在高速冷冻离心机上以10 000 r/min离心10 min，取上清液作酶源。27℃、测定记录5 min内OD变化值。（4）酶源蛋白质含量测定（Bradford，1976）：酶源制备同乙酰胆碱酯酶比活力测定。反应条件为25℃，保温2 min。（5）羧酸酯酶米氏常数K_m和最大反应速度V_{max}的测定：K_m反映酶对底物的亲和力，K_m值低表示其亲和力高，反之，K_m值越高则表示亲和力越低；V_{max}代表酶活力，V_{max}越大说明酶浓度越大或酶活力越高。测定方法同羧酸酯酶的比活力测定。

2　结果与分析

2.1　桔全爪螨对齐墩螨素和甲氰菊酯的抗性发展动态

桔全爪螨对齐墩螨素的抗性开始增长较快，F_3～F_9代为缓慢增长阶段，F_9～F_{12}为抗性突增阶段，选育至12代，抗性增长到7.30倍（表1）。

桔全爪螨对甲氰菊酯的抗性发展迅速。在选育过程中，开始抗性发展比较缓慢，从F_6代开始，抗性飞速发展，F_6～F_{12}代为抗性突增阶段，选育至12代，抗性增长到17.11倍（表2）。

表1　桔全爪螨对齐墩螨素的抗性发展动态

Table 1　Development of *P. citri* resistance to abamectin by selection

选育代数 Selected generation	毒力回归式 Toxic model	相关系数 r	LC_{50} * (mg/L)	抗性倍数 R/S
F_0	$y=8.2961+1.6872x$	0.99	0.0111（0.0090～0.0137）	1
F_3	$y=11.2845+4.5297x$	0.98	0.0410（0.0365～0.0460）	3.63
F_6	$y=8.7115+2.9357x$	0.95	0.0544（0.0378～0.0728）	4.81
F_9	$y=7.0597+1.6849x$	0.99	0.0599（0.0505～0.0711）	5.30
F_{12}	$y=6.9295+1.7807x$	0.99	0.0825（0.0699～0.0974）	7.30

* 半致死浓度，括号内为95%置信限，下同

Median lethal concentration, data in brackets were 95 percent confidence limit. The same belows

表2 桔全爪螨对甲氰菊酯的抗性发展动态

Table 2 Development of *P. citr* resistance to fenpropathrin by selection

选育代数 Selected generation	毒力回归式 Toxic model	相关系数 r	LC_{50} * (mg/L)	抗性倍数 R/S
F_0	$y = -2.7206 + 6.0189x$	0.98	19.1752（18.2628～20.1332）	1
F_3	$y = 2.7408 + 1.4928x$	0.99	32.6126（27.8349～36.9734）	1.70
F_6	$y = 2.4528 + 1.3595x$	0.98	74.7529（60.7412～91.9967）	3.90
F_9	$y = 1.9777 + 1.3010x$	0.99	210.3658（162.8435～271.7564）	10.97
F_{12}	$y = -1.5212 + 2.5919x$	0.99	328.1031（272.1079～395.6213）	17.11

表3 不同增效剂对齐墩螨素的增效作用

Table 3 Synergism of different synergists to abamectin

药剂 Chemicals	毒力回归式 Toxic model	相关系数 r	LC_{50} (mg/L)	增效倍数 Synergism ratio
齐墩螨素 abamectin	$y = 7.6262 + 2.3489x$	0.98	0.0762（0.0611～0.0950）	1
齐墩螨素 + DEM abamectin + DEM	$y = 7.8798 + 2.9679x$	0.99	0.1071（0.0958～0.1197）	0.71
齐墩螨素 + TPP abamectin + TPP	$y = 7.3121 + 1.9470x$	0.99	0.0649（0.0539～0.0782）	1.17
齐墩螨素 + PBO abamectin + PBO	$y = 8.5122 + 2.6667x$	0.99	0.0282（0.0418～0.0554）	2.70
齐墩螨素 + SV_1 abamectin + SV_1	$y = 7.3859 + 2.0232x$	0.99	0.0662（0.0555～0.0789）	1.15

DEM：diethyl maleate；TPP：triphenyl phosphate；PBO：piperoayl butoxide

表4 不同增效剂对甲氰菊酯的增效作用

Table 4 Synergism of different synergists to fenpropathrin

药剂 Chemicals	毒力回归式 Toxic model	相关系数 r	LC_{50} (mg/L)	增效倍数 Synergism ratio
甲氰菊酯 fenpropathrin	$y = -1.5298 + 2.5979x$	0.99	326.1985（270.9278～392.7448）	1
甲氰菊酯 + DEM fenpropathrin + DEM	$y = 2.9054 + 1.2391x$	0.99	49.0265（38.5712～62.3159）	6.65
甲氰菊酯 + TPP fenpropathrin + TPP	$y = 3.0256 + 1.3015x$	0.99	32.8872（19.1451～56.4932）	9.92
甲氰菊酯 + SV_1 fenpropathrin + SV_1	$y = 1.1158 + 1.9593x$	0.99	96.0434（80.3354～114.8227）	3.40
甲氰菊酯 + PBO fenpropathrin + PBO	$y = -1.1436 + 2.4586x$	0.99	315.3908（261.5805～380.2704）	1.03

DEM：diethyl maleate；TPP：triphenyl phosphate；PBO：piperoayl butoxide

2.2 增效剂对齐墩螨素和甲氰菊酯的增效作用

所用4种增效剂分别为谷胱甘肽转移酶抑制剂DEM，多功能氧化酶抑制剂PBO，羧酸酯酶抑制剂TPP以及多功能氧化酶和酯酶抑制剂SV_1。

PBO对齐墩螨素增效2.70倍，其它几种增效剂均未表现出明显的增效作用，说明多功能氧化酶解毒作用的增强是桔全爪螨对齐墩螨素产生抗药性的原因之一（表3）。

TPP、DEM和SV_1对甲氰菊酯均表现出非常显著的增效作用，因此可以认为桔全爪螨对甲氰菊酯的抗性与羧酸酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶和多功能氧化酶活性的增强有关（表4）。

2.3 桔全爪螨不同品系羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶比活力测定结果

抗齐墩螨素品系的乙酰胆碱酯酶的比活力高于敏感品系的，而羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的比活力均低于敏感品系的，由此可以认为乙酰胆碱酯酶比活力的提高是桔全爪螨对齐墩螨素产生抗药

表 5 桔全爪螨不同品系羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶的比活力

Table 5 Activities of carboxylesterase, acetylcholinesterase and glutathionr-transferase in different *P. citri* strains

品系 Strains	羧酸酯酶比活力 CarE activity (μmol/L/mgPro/min)	乙酰胆碱酯酶比活力 AChE activity (μmol/L/mgPro/min)	谷胱甘肽转移酶比活力 Glu-tran activity (OD/mgPro/min)
敏感品系 S-strain	0.3105 b (0.2881 ~ 0.3180)	0.2105 a (0.1807 ~ 0.2224)	0.2503 b (0.2287 ~ 0.2640)
抗齐墩螨素品系 R-abamectin	0.2496 a (0.2020 ~ 0.2624)	0.4083 b (0.3724 ~ 0.4381)	0.0439 a (0.0397 ~ 0.0441)
抗甲氰菊酯品系 R-fenpropathrin	0.5468 c (0.4983 ~ 0.5642)	0.6657 c (0.6004 ~ 0.7020)	0.4310 c (0.4207 ~ 0.4389)

表中数据经 Duncan 新复极差检验，同列数据后不相同字母者表示在 0.05 水平上差异显著。下同

Data in table were tested by Duncan's test, different letter mean data in same row vary remarkable at 0.05 level. The same belows

表 6 桔全爪螨不同品系羧酸酯酶米氏常数 K_m 及最大反应速度 V_{max}

Table 6 Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) of carboxylesterase in different *P. citri* strains

品系 Strains	K_m Michaelis constant (μmol/L)	相对敏感品系倍数 R/S	V_{max} Maximum velocity (μmol/L/mgPro/min)	相对敏感品系倍数 R/S
敏感品系 S-strain	0.3487	1	0.8196 ab (0.7909 ~ 0.8203)	1
抗甲氰菊酯品系 R-fenpropathrin	0.9999	2.87	0.9449 b (0.9327 ~ 0.9584)	1.15
抗齐墩螨素品系 R-abamectin	0.2712	0.54	0.6229 a (0.6208 ~ 0.6584)	0.76

性的原因之一，与羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶无关。

抗甲氰菊酯品系的羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的比活力均高于敏感品系的，二者之间存在显著性差异，说明桔全爪螨对甲氰菊酯的抗药性与这三种酶比活力的提高有关。

2.4 桔全爪螨不同品系羧酸酯酶米氏常数（K_m）及最大反应速度（V_{max}）的测定结果

抗甲氰菊酯品系的 K_m 和 V_{max} 分别为敏感品系的 2.87 倍和 1.15 倍，说明抗甲氰菊酯品系中羧酸酯酶的比活力与敏感品系相比有所增加，但其与底物的亲和力却下降，说明羧酸酯酶比活力的增加是桔全爪螨对甲氰菊酯产生抗性的原因之一。抗齐墩螨素品系的 K_m 和 V_{max} 与敏感品系之间无显著性差异，进一步说明桔全爪螨对齐墩螨素的抗药性与羧酸酯酶无关（表 6）。

3 讨论

齐墩螨素的作用机制是通过干扰害虫体内神经末梢的信息传递，使害虫在几小时内迅速麻痹、拒食、缓动或不动，由于不引起害虫迅速脱水，故其作用机制不及有些神经毒剂作用快，但它已麻痹害虫，使其极少取食，同样达到使作物免遭危害的目的。作为抗生素类杀虫杀螨剂，齐墩螨素具有活性高、易分解、无生物积累和残留、不污染环境，在常用剂量内对天敌、人畜安全等优点，是害虫、害螨综合治理和绿色食品生产所需的理想药剂。从本研究结果看，桔全爪螨对齐墩螨素的抗性增长速度虽不及对甲氰菊酯快，但仍发展迅速。据报道，家蝇 *Musca domestica*（Scott，1989，1991）、二斑叶螨 *Tetranychus urticae*（Compos *et al.*，1995，1996；Clark，1994）、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（Argentine，1992）、小菜蛾 *Plutella xylostella*（Jansson，1996）、德国蜚蠊 *Blattella germanica*（Scott，1991）等对齐墩螨素均产生了抗药性。Scott 等（1991）认为家蝇对齐墩螨素的抗药性与表皮穿透性降低和多功能氧化酶的代谢增强有关；Campos（1996）认为氧化代谢在二斑叶螨对齐墩螨素的抗性中起一定的作用，但不是主要因子，选育得到的不同品系抗性机制有所差别，有的与表皮穿透性降低有关，有的与螨体对药剂的排泄能力增强有关；马铃薯甲虫对齐墩螨素的抗性与多功能氧化酶、羧

酸酯酶活性的增强有关（Argentine *et al.*，1992）。作者认为桔全爪螨体内多功能氧化酶和乙酰胆碱酯酶活性的提高是其对齐墩螨素产生抗性的主要原因。为延缓桔全爪螨对齐墩螨素抗性的发展速度，延长该药剂的使用寿命，对其进行抗药性检测及治理极其重要。

参 考 文 献（References）

Argentine J A，Clark J M，Lin H，1992. Genetics and biochemical mechanism of abamectin resistance in two isogenic strains of Colorado potato beetle. *Pestic. Biochem* Physiol.，(44)：191～207.

Bradford M M，1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein binding. *Anal. Biochem.*，(72)：248～254.

Campos F，Dybas R A，Krupa D A，1995. Susceptibility of two spotted spider mite (Acari：Tetranychidae) populations in California to abamectin. *J. Econ. Entomol.*，88 (2)：225～231.

Campos F，Krupa D A，Dybas R A，1996. Susceptibility of populations of two spotted spider mites (Acari：Tetranychidae) from Florida，Holland and the Canary Islands to abamectin and characterization of abamectin resistance. *J. Econ. Entomol.*，89 (3)：594～601.

Chen Q Y，Jiang J L，Lin G F，*et al.*，1980. Studies on the resistance of dipterex-resistant mosquito *Culex pipiens pallens* Coq. —on the relationship between hydrolase and resistance. *Acta Entomol. Sin.*，23 (4)：350～357.［陈巧云，姜家良，林国芳等，1980. 淡色库蚊对敌百虫抗性的研究——水解酶同敌百虫抗性关系. 昆虫学报，23 (4)：350～357］

Clark J M，Scott J G，Campos F，*et al.*，1994. Resistance to avermectin：extent，mechanisms，and management implications. *Annu. Rev. Entomol.*，(40)：1～30.

FAO，1980. Plant Production and Protection 21，Recommended Methods for Measurement of Resistant to Pesticides. 49～54.

Jansson R K，Rugg D，1996. In Proceedings of ⅩⅩ International Congress of Entomology，610. Florence，Italy.

Jiang J L，Chen Q Y，Huang G，*et al.*，1980. On the properties of carboxylesterase in OP-resistant and susceptible mosquitoes，*Culex pipiens pallens*. *Conter. Shanghai Inst. Entomol.*，(1)：69～76.［姜家良，陈巧云，黄 刚等，1980. 抗有机磷淡色库蚊的羧酸酯酶研究. 昆虫学研究集刊，(1)：69～76］

Mu L Y，1994. Research Methods of Plant Chemical Protection. Beijing：China Agricultural Press. 160～161.［慕立义，1994. 植物化学保护研究方法. 北京：中国农业出版社. 160～161］

Scott J G，1989. Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethrin resistance strains of house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.*，(34)：27～31.

Scott J G，1991. Toxicity of abamectin and hydramethylnon to insecticides susceptible and resistance strains of German cockroach (Dictyoptera：Blatellidae). *J. Agric. Entomol.*，(8)：77～82.

Scott J G，Roush R T，1991. Selection of high-level abamectin resistance from field-collected house flies *Musca domestic*. *Experientia*，(47)：288～291.